



TITLE:

腎結核に於けるアミノ酸の研究(ペーパークロマトグラフィーに依る)
第I編:腎結核組織内遊離アミノ酸
の分布(臨床実験成績)

AUTHOR(S):

松浦, 省三

CITATION:

松浦, 省三. 腎結核に於けるアミノ酸の研究(ペーパークロマトグラフィーに依る) 第I編:腎結核組織内遊離アミノ酸の分布(臨床実験成績). 泌尿器科紀要 1957, 3(6): 363-371

ISSUE DATE:

1957-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/111469>

RIGHT:

腎結核に於けるアミノ酸の研究

(ペーパークロマトグラフィーに依る)

第 1 編 腎結核組織内遊離アミノ酸の分布(臨床実験成績)

久留米大学医学部泌尿器科学教室(主任 重松教授)

助手 松 浦 省 三

Studies on the Amino Acids in Tuberculous Kidney by Means of Paper Chromatography

Part I : The Distribution of Free Amino Acids in Tuberculous Renal Tissue (The Results of Clinical Experiments)

Syozo MATSUURA

From the Department of Urology, Kurume University School of Medicine
(Director : Prof. S. Shigematsu)

The partition chromatography designed by Martin and Synge, and the paper partition chromatography generalized by Consden, Gordon and Martin in 1949 have caused excellent results in various fields of science. Moreover since the first introduction of the detailed techniques by Hagioka in 1949, many investigations, using this method, have been made.

With the consideration that the correlation, if any, would be found out between the amount of free amino acids in the tuberculous focus and that in other tissue, many experiments were done for several years by using the paper partition chromatography and revealed the facts described in the following three parts.

In this part of the report, the basic experiment to paper partition chromatography and the method adopted by this author are described, and then the free amino acids within the cavity tissue of thirty kidneys extirpated under the diagnosis of kidney tuberculosis are qualitatively distinguished by applying the two dimension method of paper partition chromatography.

The following fifteen free amino acids could be easily recognized asparatic acid, glutamic acid, tyrosine, serine, valine, leucine, alanine, threonine, glycine, phenylalanine and arginine,

Six amino acids of cystine, proline, histidine, lysine, phenylalanine and arginine are easily fluctuated when the condition varies.

In the ten extirpated tuberculous kidneys the free amino acids contained only in the caseous substance of its kidney were distinctly observed by the same way, and they were serine, glutamic acid, asparatic acid, alanine, glycine, tyrosine, valine, threonine, cystine, phenylalanine, proline, leucine, histidine and methionine.

The seven amino acids after threonine in the above described amino acids appear in less frequency and change in quantity and quality by the degree of proteolytic process,

緒 言

Chromatography は1906年 Tswett が始めて粉糖を用いてクロロフィルの分析を行い、次いで Kuhn が炭酸石灰を用いて卵黄色素の Lutein と Zeaxanthin との分離に成功して以来その価値が再認識されて広く各方面に利用せられるに到った。最近 Martin and Synge は partition chromatography なるものを考案した。此の方法によると被検液中の成分は、水相と非水相との間に分配せられる分配係数の相違に基いて分離せられる。更に1944年になつて Consden, Gordon and Martin は Cellulose を濾紙の形で水相保持の定常相として利用する利点を見出した。本法の原理を応用して最も普通に用いられつつあるものが paper partition chromatography である。

本邦にあつては1949年、蕨岡により欧米の本操作が詳細に報告されてその応用範囲の広汎な点が注目されて以来、各界にあつて本法応用による研究業績が挙げられて来た。

私は此の paper partition chromatography を応用して腎結核感染巣と組織内遊離アミノ酸の変動との間に、何等かの相関関係を見出し得るものと考え数年来此の研究に従事して来て、一応の結論を得たので此処にその成績を一括報告する次第である。尙本実験を述べるにあたり便宜上下記の3編に分ち各項にあつてその成績を述べて行く事にする。

一般的基礎実験ならびに実験方法

paper partition chromatography をその実験方法として採用する以上、下記の各項は何れも実験者によつて異なるので私の実験に於いて採用した方法を一応略述する。尙その後に行つた本実験は何れも此の基礎的実験ならびにその実験方法に準じて行つたものである。

1) 濾紙.

paper partition chromatography に使用する濾紙の性質はその成果に極めて重要な意義を有する事は論をまたない。伝聞する所によると Whatman 濾紙 No. 1, 2, 3, 或は Schleicher and Schull 濾紙 No. 597 等の極めて優秀な濾紙の存在があるが、実

際当事者にとつてこれをそのまま使用するわけにはゆかないので、私は使い慣れた 国産東洋濾紙を使用した。桑田、水野、那波等は同社製品 No. 131 を、音在は No. 3 を推奨されている。私は同社製品 No. 50 を使用した。此の No. 50 を指定するに当り以下述べてゆく条件において頻回の同一展開操作を行い、その Rf 値を測定し殆んどその差の無い事を確めた。

2) 展開溶剤.

第一次溶剤として比較的展開能の広い即ち Rf 値の高い酸性溶剤 phenol (片上化学特級品) を使用した。即ち phenol 120, 水30, 之に0.1%の新鮮アンモニア水を10%に添加したものを使用した。第二次溶剤として N-Butanol 4, 氷醋酸2, 水1の割合で調製した飽和ブタノール溶液を使用した。本剤は phenol に比べて Rf 値一般に低値であつて、第一次展開との間に分離度を測定するに便であるので使用した。勿論両剤とも製品純度の高いものを使用した。

3) 指示薬.

一般にアミノ酸の指示薬として用いられている Ninhydrin を使用した。本剤はアミノ酸、ペプチド、蛋白質の類で遊離したカルボシル基とその α -位に遊離アミノ基を持つ物質に反応して特有の紫色系統の発色を呈する。本剤も勿論純度の高いものが要求される。私は本邦第一化学の製品を使用した。使用に當つてその都度 0.2% Ninhydrin 含水ブタノール溶液を調製し指示薬とした。

4) 発色.

上記0.2% Ninhydrin 含水ブタノールを完全に風乾された処理済み濾紙に噴霧し、90°Cの乾熱器内に7~8分入れて急激に乾燥させると、それぞれの Rf 値に従つて美麗な固有発色を伴つた spot を得る事が出来る。

5) 展開温度.

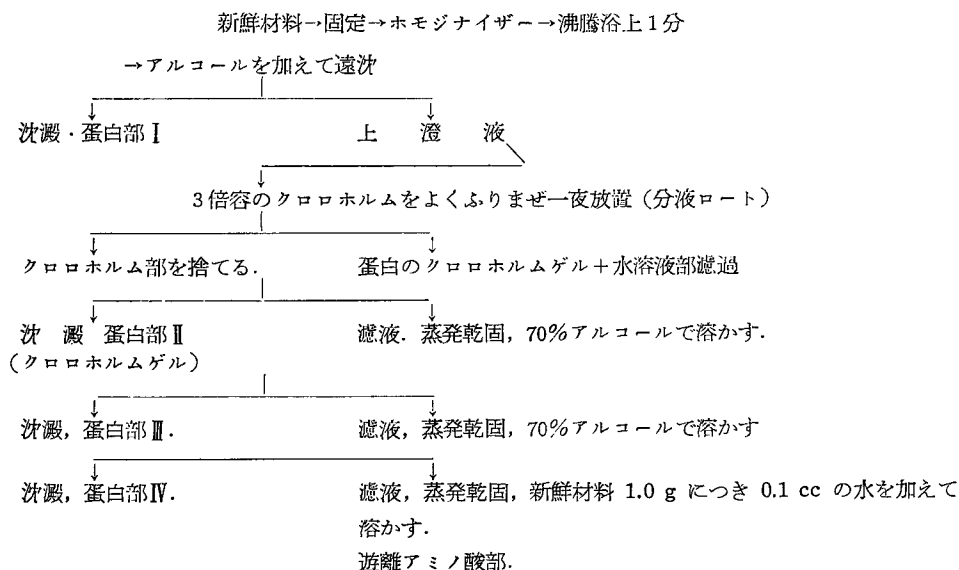
大体室温に於いて行つた。冬期低温に於いてその展開に可成りの時間を要したが Rf 値そのものには大なる変動は来さなかつた。

6) 試料.

濾紙の原点に添加される試料は与う限り狭雑物を除き精製された遊離アミノ酸加水分解物である事が望ましい。狭雑物の存在はその展開、spot の発色等に大なる障害を与える。私が実験に供した材料は主に組織片ならびに組織液、組織破壊物等である。よつて本質的には Awapara の方法に従つた。即ち新鮮組織(結核空洞包含腎組織)を生理的食塩水で灌流脱血約1分間、

秤量後細片として約 20 倍容のアルコールで 24 時間固定, その後固定組織に数倍量の溜水を加え, ホモジナイザーで均一液とし沸騰温浴 1 分間加温後固定に用いたアルコールを加えて遠沈し, 以下示すが如く順次濃

縮を行つて最終段階に於いて 1.0 g につき 0.1 cc の溜水にて溶解, 遊離アミノ酸部を抽出する. 此の目的とする所はなるべく遊離アミノ酸以外の狭雑物を取り除く事にある.



上記操作は示す通りの回数で尚不充分の事もあるからその時は 70% アルコール乾固の項を更に重複して除塩操作を行う.

次に試料が血液, 胆汁, 貯留液等である場合は原則的には Folin and Wu のタングステン酸抽出法を応用した. 即ち試薬として下記の物を必要とする.

- 1) 10 g/dl タングステン酸ソーダ溶液.
- 2) 2/3N 硫酸.

試料 5.0 cc を 100 cc の三角コルベンにとり, 溜水 35 cc にて稀釈, タングステン酸ソーダ液 5.0 cc, 2/3N 硫酸 5.0 cc を少しづつ加える. 混和振盪して泡沫がなくなれば正しく除蛋白された事を示す. 除塩は 70% アルコールを使用する事で満足した. 以下の濃縮操作は先述に準じた.

かくして精製された濃縮試料はほぼ満足すべきアミノ酸抽出液であると見做される. 該液は比較的早期に破壊変質するので可及的早期に濾紙に添加する必要がある. 柴谷はかくして得られた遊離アミノ酸部の保存は多くの場合非常に困難だと述べて居る. 即ち水でうすめてアンプルに封入滅菌して保存しても, 蒸発乾固してデシケーター内で保存しても, 70% アルコールに溶かしておいても, 数日のうちにニンヒドリンの呈色反応が弱くなり又全くなくなつて仕舞う. これに反して濾紙に滴下されたアミノ酸は, はるかに安定で 2

～3 日放置後展開してもその呈色反応は殆んどよまゐる事がない. 私も濾紙に滴下された濃縮試料は 3～4 日経ても, その展開能, 呈色能に大なる変動のない事を確めた. 濾紙上に於いては確に比較的安定の様である.

7) Rf 値.

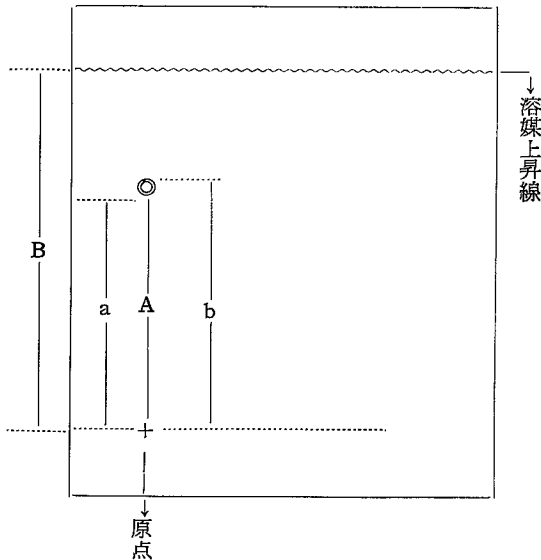
Rf 値に関して現在迄種々の Rf 値が発表されているが, この Rf 値に関する限りそれぞれの研究者独自のものであつて, 濾紙, 溶媒, その他条件, 操作, 千差万別であつて, 他の研究者の Rf 値を以つて云々する事は出来ない. ただその相対比は大なる差がない筈である. 私は下記に掲げる如き方法で spot の中心点を決定し, 信頼し得る同一条件の 5 枚の濾紙から得た平均値を以つてそのアミノ酸の標準 Rf 値とした. 但しこれは私の実験に於いてのみ標準となり得るのであつて, 他の実験者への Rf 値とはなり得ない.

図にみる様に spot の中心を決定しそのアミノ酸の Rf 値を決定した. 即ち原点から上昇して呈色された spot は点でなく範囲がある. 依つてこの spot の上下端にそれぞれ原線に平行な高さを測定し然る後にこの spot の中心点を決定した. 此の決定された中心点と溶媒の動いた距離との比からそのアミノ酸の Rf 値を決定した. 以後の Rf 値はすべて此の方法で算出したものである. 二次展開に於いても全く同様であ

る。

以上の方法により得た標準 Rf 値は表 1～3 に掲げ

る通りである。尚標準アミノ酸としては、宝製薬のアミノ酸測定用セット中のアミノ酸を使用した。



a : 原点から移動したSpotの下端迄の距離。

b : 原点から移動したSpotの上端迄の距離。

A : 原点から移動したSpotの中心迄の距離。

$$\frac{a+b}{2} = A$$

B : 原点から上昇した溶媒の動いた距離。

$$\text{Rf 値} = \frac{A}{B}$$

実験成績

実験材料並に実験方法

臨床的に腎臓結核の診断の下に剔出せられた結核罹患腎に於いて、結核性空洞形成の単発せる所を選び、空洞壁を 1～2 mm おいて空洞周囲組織よりそれぞれ 2.0g を秤量して採取した。此の組織を前述せる如く処理精製して遊離アミノ酸を抽出し、その 0.05 cc を最大容量として試料に供した。又定型的乾酪様物質を包含する腎にあつてはその 5.0 cc を吸引採取先述の如く処理して同様試料とした。

実験成績

濾紙上に明らかに分離し得た遊離アミノ酸は表 4 に示す如く 15 種であつた。その種類は必発せるものからただ 1 例のみに認め得たもの迄含めて 15 種である。即ち必発したアミノ酸としては Asparatic Acid, Glutamic Acid の 2 種であり、他は 30 例すべてに於いて認めると云うわけではなかつた。頻度の多いものから列記してみよう。Asparatic Acid 30/30, Glutamic Acid 30/30, Tyrosine 25/30, Serine, Valine それぞれ 24/30, Leucine 22/30, Alanine 17/30, Threonine 15/30, Glycine 10/30, Cystine 3/30, 次いで Proline, Histidine, Lysine それぞれ 2/30, Phenylalanine, Arginine 各 1/30 である。尚判定し得ない spot として 7～1 ケの表示するが如き Rf 値を得た。(表に示すは 0, 以下の数値である。表の都合で省略する。)

次にその発色度であるが表中 (5) に示した通りである。() 内に示す + の規準は、最も発色強きもの (卅), 中等度発色 (廿), 軽度発色 (+), かろうじて推測し得る発色 (±) と 4 段階に分けた。確認し得たアミノ酸斑の発色の強さのみに依つてこれを眺めれば表 5 の如く一括表示する事が出来る。此の発色の強さは概して最終試料中に含まれる遊離アミノ酸の濃度に比例していると考えられる。故に濃い spot はそれだけ多くのそのアミノ酸を含む事となり、薄い spot はそれだけ薄い濃度にしか存在しないと云う事を推察し得るわけである。

次に剔出腎に於ける乾酪様物質のみについての遊離アミノ酸の分布状態は表 6 に示す通りである。確認し得た遊離アミノ酸は Asparatic Acid 以下 Methionine に到る 14 種であつた。この各種アミノ酸を出現頻度によつて列記すれば下記の如くなる。Serine 9/10, Glutamic Acid 8/10, Asparatic Acid, Alanine, Cystine それぞれ 6/10, Tyrosine, Valine 5/10, Threonine 3/10, Cystine, Phenylalanine 2/10, Proline, Leucine, Histidine, Methionine それぞれ 1/10, 以上の 14 種類である。判定し難い spot は第 6 症例の 7 ケより第 10 例の 0 に判る各症例に示す通りである。このそれぞれの spot をその発色程度によつて分類して一括第 7 表の通りである。

以上の実験操作に於いて誤差を可及的僅少に止めるために、可及的同一条件にて行ふ様に細心の注意を執

った。又標準 Rf 値の追加確認を頻回に行つて此の成績に變動のない事を確めつつ実験は続行して來た。又試薬は常に新鮮な物を使用した。

總括ならびに考按

本項においては、腎臓結核の診断の下に手術的に剔出せられた腎組織中空洞形成を認めた30例について、空洞組織を含む腎組織内の遊離アミノ酸の分布を二次元ペーパークロマトグラフィーを応用して追求し、又定型的乾酪様物質を包含せる腎10例を選んでその乾酪様物質に含まれる遊離アミノ酸の分布を追求した。

元来アミノ酸の種類として従来の文献によると大体に於いて下記の如く5大別し得る。

- 1) 蛋白質構成アミノ酸。
- 2) 蛋白質の成分とされたがその常成分としては疑わしいか、あるいはその存在の疑わしいアミノ酸。
- 3) 蛋白質以外から分離された天然アミノ酸及び二次的に生成し得るアミノ酸。
- 4) α -アミノ酸以外のアミノ酸。
- 5) 存在の主張が不十分なその他のアミノ酸。

私の実験に於いて対象となるアミノ酸は第一項に属する蛋白質構成アミノ酸である。此の蛋白質を構成するアミノ酸として認められているものは20乃至22種が普通に挙げられている。その中蛋白加水分解物としての存在に疑念を挿む余地のない蛋白性アミノ酸としては下記の18種が挙げられている。Glycine, Leucine, Tyrosine, Serine, Glutamic Acid, Asparatic Acid, Phenylalanine, Alanine, Lysine, Arginine, Histidine, Valine, Proline, Tryptophan, Oxyproline, Isoleucine, Methionine, Threonine (蛋白中における発見年代順) 以上18種である。

扱て此処に結核に罹患した腎組織、特に空洞形成を生じた様な腎組織内に於ける蛋白分解の結果生じて來た遊離アミノ酸は如何なる種類を証明し得るだろうか。蛋白質は Pepsin, Papain の様な Proteinase によつて分解される事は衆知の事実であるが、結核感染による組織蛋白の破壊、融解の結果可成り多くの遊離アミノ酸が証明されて良い筈である。外松によると確

認し得たアミノ酸は、Cystine, Asparatic Acid, Glutamic Acid, Glycine, Serine, Arginine, Lysine, Histidine, Glutamine, Alanine, Proline, Valine, Leucine, Isoleucine, Tyrosine, Taurine, Cystic Acid 17種と發表している。私が30例の結核腎組織より確認し得た遊離アミノ酸はAsparatic Acid, Glutamic Acid の100%から Phenylalanine, Arginine の各3.3%に到る17種即ち Asparatic Acid, Glutamic Acid, Tyrosine, Serine, Valine, Leucine, Alanine, Threonine, Glycine, Cystine, Proline, Histidine, Lysine, Phenylalanine, Arginine であつた。以上15種の遊離アミノ酸の出現頻度は先に表示した通りであつて、全例に認め得たものと各1例づつを認めた3種迄である。

又アミノ酸の spot の呈色度、並に判定し難い spot は表を御参考願いたい。決定し難かつた spot は充分に除蛋白除塩を行つたが、やはり狭雑部、ポリペプチド等の存在によるものだろうと推察する。

以上の確認し得た spot より腎空洞組織に含まれる遊離アミノ酸は所謂蛋白構成アミノ酸として認められて居る18種のアミノ酸を殆んど含有すると云う事実を確めた。ただCystine 3/30, Proline, Histidine, Lysine のそれぞれ2/30, Phenylalanine, Arginine の各 1/30 の6種はその頻度から云つて少数例であつた。この6種のアミノ酸は残余のアミノ酸に比して条件如何によつて変動性大なる遊離アミノ酸であろうと推察される。

次に剔出腎に於ける乾酪様物質のみに含まれる遊離アミノ酸の分布は Asparatic Acid 以下表示の如く14種を確認した。元来乾酪様物質の主体をなすものは、白血球の集中浸潤による組織の蛋白分解の激化、更に進んで白血球の崩解産物、組織の融解壊死片等であるからより多くの遊離アミノ酸を同定し得るものと考えたが、結果は必ずしも一致せず、むしろ空洞周囲組織内アミノ酸より少い種類のアミノ酸しか確認し得なかつた。此の事は組織の蛋白分解、更に進んで自己融解、壊死巣とその変化の進行に

つれてかかる結果を招来したものだろうと考える。玉置に依ると整形外科領域において、寒性膿瘍を穿刺して得た膿漿蛋白加水解試料から Serine, Glycine, Lysine, Histidine, Arginine, Alanine, Tyrosine, Proline, Leucine, Phenylalanine, Valine の11種を確認し尙 Proline の相対量が多いと結論して居る。尙又寒性膿瘍が瘻孔を形成して外界と交通し混合感染を証明し得た例に於いては、その含まれる遊離アミノ酸の種類は、閉鎖性膿瘍に比して質的に多くのアミノ酸を証明して居る。腎結核に於ける乾酪様物質は、白血球残査、破壊産物、結核菌をその主成分とし所謂二次感染、混合感染と云う事は殆んど考えられない。その結果此の乾酪様物質から得られたアミノ酸はあく迄生体内での蛋白分解の結果である。私は表示の如き内容で Serine, Glutamic Acid, Asparatic Acid, Alanine, Glycine, Tyrosine, Valine, Threonine, Cystine, Phenylalanine, Proline, Leucine, Histidine, Methionine の14種を分離確認し得た。

結 論

1) 腎臓結核剔出腎30例を選び、その空洞組織内遊離アミノ酸を paper partition chromatography 二次元法を応用して下記のアミノ酸を分離確認した。

Asparatic Acid, Glutamic Acid, Tyrosine, Serine, Valine, Leucine, Alanine, Threonine, Glycine, Cystine, Proline, Histidine, Lysine, Phenylalanine, Arginine, 以上15種である。

2) Cystine, Proline, Histidine, Lysine, Phenylalanine, Arginine の6種は条件如何によつて変動性大なる遊離アミノ酸であろうと推察される。

3) 剔出腎中10例を選び乾酪物質のみに含まれる遊離アミノ酸を同様方法にて下記14種を確認した。

Serine, Glutamic Acid, Asparatic Acid, Alanine, Glycine, Tyrosine, Valine, Threonine, Cystine, Phenylalanine, Proline,

Leucine, Histidine, Methionine.

4) 乾酪様物質に含まれる遊離アミノ酸はその頻度に於いて、確認し得た種類については Threonine 以下7種は極めて少であり、その蛋白分解の段階により各々異り、質的、量的に変動のある事がうかがわれる。

終りに代表的クロマトグラフを掲げる。

(文献後掲)

第一編附図(1~2)

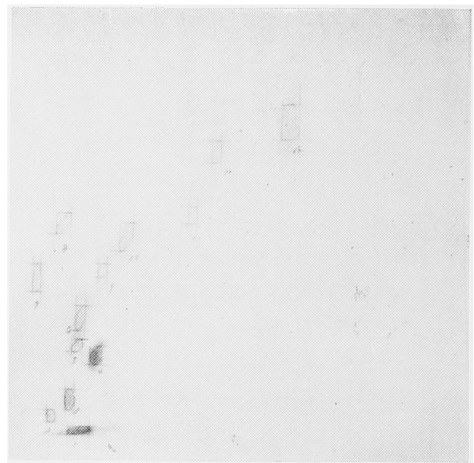


Fig. 1. Chromatography.
Free amino acids of cavern wall
(clinical case No. 28).

- | | |
|--------------------|---------------|
| 3. Asparatic acid. | 10. Tyrosine. |
| 4. Glutamic acid. | 12. Alanine. |
| 6. Serine. | 13. Leucine. |
| 9. Glycine. | |

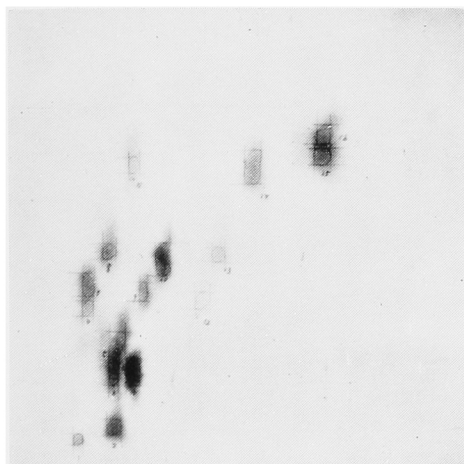


Fig. 2. Chromatography.
Free amino acids of cavern wall
(clinical case. No. 29).

- 2. Asparatic acid.
- 4. Glutamic acid.
- 10. Threonine.
- 11. Proline.
- 14. Valine.
- 16. Leucine.

Table 2. BUTANOL Rf (average)

	No.1	No.2	No.3	No.4	average
D, L-Methionine	0.50	0.51	0.49	0.50	0.50
L-Phenylalanine	0.59	0.61	0.58	0.61	0.60
Hydroxy-L-Proline	0.24	0.26	0.27	0.26	0.25
D, L-Alanine	0.27	0.34	0.27	0.25	0.31
L-Lysine monohydrochloride	0.14	0.15	0.14	0.15	0.15
Cystine	0.16	0.17	0.17	0.17	0.17
D-L-Serine	0.20	0.23	0.20	0.23	0.22
Glycine	0.18	0.19	0.18	0.15	0.18
Asparatic Acid	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
D, L-Threonine	0.33	0.32	0.34	0.31	0.32
L-Leucine	0.66	0.65	0.65	0.67	0.66
D, L-Valine	0.54	0.53	0.55	0.53	0.54
L-Proline	0.40	0.41	0.41	0.40	0.40
L-Tyrosine	0.48	0.48	0.51	0.48	0.49
L-Glutamic Acid	0.31	0.36	0.32	0.36	0.34
L-Histidine	0.23	0.20	0.24	0.22	0.22
Arginine	0.25	0.26	0.24	0.24	0.25
Tryptophan	0.58	0.56	0.55	0.58	0.57

Table 1. PHENOL Rf (average)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	average
D, L-Methionine	0.79	0.82	0.84	0.85	0.83	0.83
L-Phenylalanine	0.87	0.87	0.87	0.91	0.88	0.88
Hydroxy-L-Proline	0.71	0.71	0.76	0.72	0.72	0.72
D, L-Alanine	0.58	0.61	0.63	0.61	0.60	0.60
L-Lysine monohydrochloride	0.79	0.71	0.78	0.80	0.79	0.77
Cystine	0.27	0.28	0.27	0.27	0.27	0.27
D, L-Serine	0.39	0.38	0.38	0.41	0.41	0.39
Glycine	0.56	0.43	0.43	0.40	0.44	0.46
Asparatic Acid	0.17	0.13	0.16	0.16	0.16	0.16
D, L-Threonine	0.50	0.52	0.49	0.50	0.53	0.51
L-Leucine	0.85	0.85	0.83	0.86	0.86	0.85
D, L-Valine	0.82	0.80	0.80	0.78	0.77	0.79
L-Proline	0.86	0.82	0.83	0.90	0.85	0.85
L-Tyrosine	0.61	0.56	0.58	0.58	0.61	0.59
L-Glutamic Acid	0.31	0.21	0.21	0.22	0.21	0.21
L-Histidine	0.69	0.72	0.74	0.71	0.68	0.71
Arginine	0.86	0.84	0.83	0.85	0.86	0.85
Tryptophan	0.85	0.82	0.83	0.84	0.84	0.84

Table 3. STANDARD Rf.

	Phenol	Butanol	Color of Spot
D, L-Methionine	0.83	0.50	purple
L-Phenylalanine	0.88	0.60	grey brown
Hydroxy-L-Proline	0.72	0.25	brown yellow
D, L-Alanine	0.60	0.31	purple
L-Lysine monohydrochloride	0.77	0.15	purple
Cystine	0.27	0.17	pink purple
D-L-Serine	0.39	0.22	brown
Glycine	0.46	0.18	pink purple
Asparatic Acid	0.16	0.28	purple
D, L-Threonine	0.51	0.32	pink purple
L-Leucine	0.85	0.66	purple
D, L-Valine	0.79	0.54	purple
L-Proline	0.85	0.40	yellow
L-Tyrosine	0.59	0.49	brown
L-Glutamic Acid	0.21	0.34	purple
L-Histidine	0.71	0.22	brown
Arginine	0.85	0.25	purple
Tryptophan	0.84	0.57	yellow brown

Table 4. FREE AMINO ACIDS OF CAVERN WALL (CLINICAL CASES)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Asp. Acid	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)
Glut. Acid	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)
Serine	(+)(+)	-	-	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Tyrosine	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Proline	-	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	-	-
Valine	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Leucine	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(#)	-	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Alanine	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	-	-	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Histidine	-	-	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Glycine	(+)(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	-	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Cystine	-	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(±)	-	-	-	(+)(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Threonine	-	(+)(+)	-	(+)(+)	-	-	(+)(+)	-	(+)(+)	-	(+)(+)	-	-	-	-	(+)(+)	(+)(+)	-	(+)(+)	-	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(#)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Phenyl. Al.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)
Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)(+)	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	(+)(+)	-	-	-	-	-

Table 5. COLOR OF SPOT
CAVERN WALL ON RENAL TUBERCULOSIS
(CLINICAL CASES)

	(#)	(+)	(+)	(±)	
Aspa. Acid	15	9	6	0	30
Glut. Acid	18	11	1	0	30
Serine	5	8	11	0	24
Tyrosine	3	10	11	1	25
Proline	0	1	0	1	2
Valine	11	8	5	0	24
Leucine	5	12	5	0	22
Alanine	0	3	14	0	17
Histidine	0	0	1	1	2
Glycine	0	5	5	0	10
Cystine	0	0	1	2	3
Threonine	3	5	7	0	15
Phenyl alanine	0	0	1	0	1
Lysine	0	0	2	0	2
Arginine	0	0	1	0	1

Table 7. COLOR OF SPOT
CASEOUS SUBSTANCE OF RENAL
TUBERCULOSIS (CLINICAL CASES)

	(#)	(+)	(+)	(±)	
Serine	0	4	5	0	9
Glut. Acid	6	1	1	0	8
Asp. Acid	2	4	0	0	5
Alanine	0	1	5	0	6
Glycine	0	3	3	0	6
Tyrosine	0	0	5	0	5
Valine	0	2	3	0	5
Threonine	0	3	0	0	3
Cystine	0	0	2	0	2
Phenyl alanine	0	0	2	0	2
Proline	0	0	1	0	1
Leucine	0	1	0	0	1
Histidine	0	0	1	0	1
Methionine	0	1	0	0	1

Table 6.
FREE AMINO ACIDS OF CASEOUS SUBSTANCE. (CLINICAL CASES)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Asp. Acid	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	6/10
		(#)		(#)		(#)		(#)	(#)	(#)	
Glut. Acid	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8/10
			(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	(#)	
Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	9/10
	(#)	(+)	(+)	(+)	(#)	(#)	(+)	(#)		(+)	
Tyrosine	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	5/10
		(+)		(+)		(+)	(+)			(+)	
Proline	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10
	(+)										
Valine	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	5/10
		(+)			(#)		(+)		(#)	(+)	
Leucine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1/10
									(#)		
Alanine	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	6/10
		(+)	(+)	(#)				(+)	(+)	(+)	
Histidine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1/10
			(+)								
Glycine	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	6/10
	(+)		(#)		(#)		(+)	(+)		(#)	
Cystine	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2/10
	(+)		(+)								
Threonine	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	3/10
							(#)	(+)		(#)	
Phenylalanine	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2/10
	(+)					(+)					
Methionine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1/10
								(#)			